OWE4 Blast

Centrale Opdracht BI4

Verbeteren van compost ten behoeve van champignonteelt  
*Inventarisatie, karakterisering en beheersing van microflora in champignonsubstraat*

De champignon (*Agaricus bisporus*) is een schimmel uit de familie *Agaricaceae*. Bij de productie van champignons wordt speciale compost gebruikt die bestaat uit een mengsel van onder andere paardenmest, kippenmest, stro en gips. Voordat de compost geschikt is voor gebruik ondergaat het verschillende behandelingen. Het bereidingsproces van de compost is er op gericht om een optimale voedingsbodem (o.a. suikers) voor de champignon teelt te verkrijgen en om groei van ongewenste micro-organismen te voorkomen.

**Figuur 1: Champignonteelt.** In fase 1 worden de verschillende grondstoffen (paardenmest, stro, kippenmest en gips) gemengd en bevochtigd. Fase 2 vindt plaats in speciale tunnels waarin een pasteurisatie stap (ca. 60 °C) plaatsvindt om ongewenste organismen af te doden. Vervolgens wordt de compost geënt met het mycelium van de champignon *(Agaricus bisporus)*en doorgroeit het mycelium de compost in ruim 2 weken (fase 3). Nadat de compost is doorgroeid wordt deze bij de champignontelers gevuld in de teeltcellen en afgedekt met een laagje dekaarde, een mengsel van veen en koolzure kalk. De champignons ontstaan bovenop de dekaarde nadat het mycelium vanuit de compost de dekaarde heeft doorgroeit. De dekaarde zorgt ervoor dat de luchtvochtigheid en de temperatuur niet te veel schommelt. Na een oogstperiode van 2-3 weken wordt de resterende compost uit de teeltcellen gehaald en doet vervolgens dienst als bodemverbeteraar en meststof in de land- en tuinbouw. Bron figuur: http://www.gicom.nl/champignonteelt

Een groot probleem binnen de champignonteelt is echter dat de oogst van champignons sterk kan variëren. Deels kan dit afhankelijk zijn van de bedrijfsvoering op de diverse teelbedrijven en deels is dit afhankelijk van de kwaliteit van de compost. Daarnaast komt, ondanks vele voorzorgsmaatregelen, de schimmel *Trichoderma agressivum* regelmatig in de compost voor. Deze schimmel kan in korte tijd het bed waarin de champignons geteeld worden overgroeien waardoor de oogst mislukt. Ook micro-organismen die het pasteurisatie proces in de compost overleefd hebben kunnen een negatieve of juist een positieve invloed hebben op de teelt. Deze micro-organismen vormen in de compost een microflora. De microflora in de compost zal gedurende het proces voortdurend wisselen van samenstelling en een grote rol spelen bij de afbraak van de compost (fermentatie) en de opbouw van voor de champignon geschikte structuur en voedingstoffen. Bovendien speelt de microflora een positieve of negatieve rol richting pathogene micro-organismen. Door het ontbreken van methoden om aanwezige micro-organismen in de compost te detecteren, karakteriseren en te kwantificeren bestaat er momenteel weinig inzicht in de aanwezigheid en samenstelling van microflora in de verschillende fases van het proces en de daarbij behorende invloed die de microflora heeft op teeltresultaten.

Champignontelers (vertegenwoordigd door het Productschap Tuinbouw en CNC grondstoffen B.V.) willen een duurzame oplossing waarbij een constante kwaliteit van de compost gegarandeerd kan worden en oogstvariaties als gevolg van met name pathogene micro-organismen vermeden worden. Ter indicatie: wanneer er als gevolg van een betere kwaliteit van de compost 5 % meer champignons geproduceerd zouden kunnen worden dan betekent dit in Nederland een productiviteitsverhoging ter waarde van 12-15 mln. Euro per jaar. De Champignontelers hebben daarom de volgende onderzoeksvragen geformuleerd:

* Is een betere benutting van de compost door de champignon mogelijk door het reguleren en controleren van de microflora die bij het composteringsproces betrokken is?
* Kan er een effectieve en geaccepteerde bestrijdingsmethode tegen pathogene micro-organismen en onkruidschimmels in de compost ontwikkeld worden?

Met deze vragen is het HAN Biocentre aan de slag gegaan. Om een betere sturing van de microflora in de compost mogelijk te maken wordt er door het HAN Biocentre een inventarisatie en karakterisatie van de microflora in de compost uitgevoerd gedurende de compostbereiding en gedurende de teelt. Vervolgens is de bedoeling om met deze informatie de invloed te bepalen van de aanwezigheid van verschillende micro-organismen in de microflora op de compost kwaliteit en te onderzoeken wat de correlatie is tussen de samenstelling van de microflora en de oogstopbrengsten. Er kan dan een assay ontwikkeld worden die een voorspellende waarde heeft over de kwaliteit van de compost, waardoor het mogelijk zal worden het composteringsproces aan te passen voordat de compost bij de telers wordt afgeleverd.

Uiteindelijk zal het onderzoek een beeld geven van de optimale samenstelling van de microflora zodat er op de lange termijn toegewerkt kan worden naar een betere en robuuste microbiologische controle van het composteringsproces. De invloed van schadelijke micro-organismen (zowel pathogene micro-organismen die direct gericht zijn tegen de champignon als aanwezige onkruidschimmels) die het proces verstoren zal verkleind worden doordat er naar gestreefd wordt om een optimale samenstelling van de microflora te verkrijgen die de groei van de pathogene micro-organismen en onkruidschimmels zoveel mogelijk voorkomt. Tevens wordt er gezocht naar antimicrobiële stoffen, al dan niet uitgescheiden door micro-organismen, die ingezet kunnen worden tegen deze schadelijke micro-organismen als "groene" milieuvriendelijke bestrijdingsmiddelen.

Uit literatuuronderzoek blijkt dat in de jaren '80/'90 al onderzoek is verricht naar de samenstelling van de microflora in de compost. Echter met de huidige technieken, zoals **metagenomics**, kan men hiermee veel verder komen. Om vragen zoals "Welke organismen zitten er in de compost?" of "Welke interessante genen bevatten deze micro-organismen?" die onderliggend zijn aan de onderzoeksvragen van het Productschap Tuinbouw en CNC grondstoffen B.V. te beantwoorden, is het HAN Biocentre daarom begonnen met een inventarisatie van de microflora in de compost door middel van een Metagenomics onderzoek. Het metagenomics onderzoek is uitgevoerd door middel van het sequencen van stukken uit het genoom van de micro-organismen in de compost. Gezien de enorme hoeveelheid data die het metagenomics onderzoek heeft opgeleverd is een bio-informaticus in het analyse proces onmisbaar.

Jouw taak als bio-informaticus is om (een deel van) de verkregen data te analyseren en te karakteriseren. Een belangrijke tool hiervoor is Blast, waarmee je de sequentie data kunt vergelijken met de sequenties in de database. Misschien kun je daarmee de sequentie terugvinden in de database of vindt je zo een homoloog gen of eiwit van een ander organisme.

In de komende weken ga je eerst een onderzoeksplan opstellen en vervolgens het onderzoek uitvoeren. Belangrijk in dit onderzoek is dat het analyse proces wordt geautomatiseerd en dat de resultaten van de analyse worden opgeslagen in een relationele database (de informatica-helft van deze course) en natuurlijk dat het product voldoet aan de wensen van de opdrachtgever. De opdrachtgever weet soms echter niet precies hoe het product wat hij wil hebben er uit moet zien. En/of is wat de opdrachtgever wil niet altijd technisch haalbaar. Een hele belangrijke taak van een bio-informaticus is daarom om te overleggen met de opdrachtgever hoe het eindproduct eruit moet zien en wat het moet kunnen. Dus vragen stellen aan en discussiëren met de experts/tutor om zo samen tot een eindproduct te komen waar iedereen blij mee is.

Aan het eind van het onderzoek heb je het analyse proces van een deel van de grote dataset uitgevoerd en de Blast geautomatiseerd. De resultaten van de Blast en eventueel andere delen van het analyse proces zijn opgeslagen in een relationele database. In een onderzoeksverslag (samenvatting, M&M, resultaten, discussie) beschrijf je individueel de analyse van één sequentie.

#### **Inleiding in de onderzoeksthematiek**

Hierin beschrijf je kort waarover het onderzoek gaat en je geeft enige achtergrondinformatie. De inleiding moet je zo schrijven dat niet alleen de opdrachtgever van het onderzoek (het biologische lab) het kan begrijpen, maar ook iemand die niet direct betrokken is bij het onderzoek. Zo kan het best zijn dat jouw onderzoeksplan door een manager wordt gelezen die wel een biologische achtergrond heeft maar zeker niet alle details van de onderzoeksthematiek kent. Een goede inleiding is kort en bondig en bereidt de lezer voor op de onderzoeksthematiek. Je refereert ook naar de literatuurbronnen waaruit de achtergrond informatie is verkregen en waar een lezer zich verder over het thema kan informeren. Dit geldt ook voor plaatjes en figuren.

# OWE4 Blast

## Taak 4 - 6 – Uitvoeren van het onderzoek

## Doelstellingen

Na afloop van deze taak kun je:

* Op grond van een onderzoeksplan een bio-informatica onderzoek uitvoeren.
* Over de resultaten van het onderzoek een presentatie houden.
* Een database opzetten waarin je de resultaten van je onderzoek kunt opslaan.
* Visualiseren van de resultaten van het onderzoek in een webbrowser.
* De resultaten van het onderzoek samenvatten.

### **Opdracht: Voer het onderzoek uit**

In taak 3 hebben jullie een voorlopig onderzoeksplan opgesteld. Dat onderzoeksplan is jullie leidraad voor de komende weken.

Onderzoek is echter een dynamisch proces. De planning is vaak anders dan je van te voren had bedacht Je zult dus op basis van de uitgevoerde activiteiten en de verkregen resultaten het onderzoeksplan moeten bijstellen. Het is heel goed om eens bij te houden hoeveel tijd je ergens kwijt mee was. Deze informatie kan je in een volgend project weer gebruiken. Wat belangrijk is om bij te houden voor je eindverslag is welke methoden je nu precies gebruikt hebt. Het uiteindelijke onderzoeksplan aan het einde van het onderzoek bevat dan de daadwerkelijk door jullie gehanteerde methodiek en activiteitenplanning. Deze uiteindelijke versie kun je dan gebruiken voor het schrijven van het onderzoeksverslag.

## Resultaten

* Een bijgewerkt onderzoeksplan inclusief ERD en activiteitenplanning.
* Een programma (geschreven in Python) voor de geautomatiseerde identificatie van identificatie van micro-organismen en de eiwitten die gecodeerd worden door de fragmenten.
* Een database met visualisatie van de analyseresultaten in een webbrowser.
* Een samenvatting van de verkregen resultaten die gebruikt kan worden in het onderzoeksverslag.

### **Werkbespreking**

Aan het einde van de week elke week is er een werkbespreking tussen de verschillende projectgroepen die aan dit onderzoek werken. Tijdens deze werkbesprekingen worden de voortgang, gebruikte methodes en de problemen van de projectgroepen besproken.

* Doel:
  + Wat was het doel van jouw onderzoek?
  + Welke bio-informatica vragen heb je gesteld?
* Methode:
  + Hoe werkt je Python script? Zijn er misschien problemen met het Python script?
  + Welke tools heb je gebruikt?
  + Wat was jouw onderzoeksstrategie?
  + Waarom kies je voor deze onderzoeksstrategie?
* Resultaten:
  + Wat heb je gedaan omtrent je onderzoek en wat zijn de resultaten van het onderzoek tot nu toe?
  + Hoeveel sequenties heb je in totaal geanalyseerd?
  + Bij hoeveel sequenties heb je een hit met een proteïne?
  + Bij hoeveel sequenties is het organisme duidelijk?
  + Geef voorbeelden van resultaten.
* Discussie:
  + Wat is jouw conclusie?
  + Welke problemen kwam je tegen?
  + Moest het onderzoeksplan aangepast worden? Op welke manier?
  + Kan de verkregen data in de database worden gezet?
  + Welke vervolgstappen zijn zinvol?

Het resultaat van de werkbespreking is dat duidelijk wordt wat de activiteiten en de te hanteren methoden van de daaropvolgende week zullen zijn.

Let op: Tijdens het project is de expert de opdrachtgever. Tijdens het expertuur kun je vragen stellen, maar kan de expert ook vragen aan elke projectgroep om een presentatie van 5 minuten te geven over de voortgang van het project.

I. Paffen, Copyright HAN